

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-010773

(43)Date of publication of application : 13.01.1995

(51)Int.Cl.

A61K 38/55

A61K 38/55

A61K 35/78

(21)Application number : 05-253854

(71)Applicant : MAEDA HIROSHI  
FUJI OIL CO LTD

(22)Date of filing : 12.10.1993

(72)Inventor : MAEDA HIROSHI  
MATSUMURA YASUHIRO  
TAKAMATSU SEIJI  
SHIMODA TADAHISA

## (54) ENHANCER FOR CARCINOSTATIC ACTION

(57)Abstract:

PURPOSE: To enhance the anticancer action of an agent having carcinostatic action itself by using therewith.

CONSTITUTION: This enhancer for carcinostatic action contains a soybean Kunitz type trypsin inhibitor or its derivative as an active ingredient.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 09.11.1993

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2083840

[Date of registration] 23.08.1996

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right] 10.01.2002

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-10773

(43) 公開日 平成7年(1995)1月13日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

A 6 1 K 38/55

35/78

識別記号

ADU

AGA

ADS J 8217-4C

8314-4C

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

A 6 1 K 37/ 64

ADU

AGA

審査請求 有 発明の数 1 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号

特願平5-253854

(62) 分割の表示

特願昭61-20362の分割

(22) 出願日

昭和61年(1986)1月31日

(71) 出願人 000201320

前田 浩

熊本県熊本市保田窪3丁目21番19号

(71) 出願人 000236768

不二製油株式会社

大阪府大阪市中央区西心斎橋2丁目1番5号

(72) 発明者 前田 浩

熊本県熊本市保田窪本町631-3

(72) 発明者 松村 保広

熊本県熊本市世安町212 世安団地 4-806

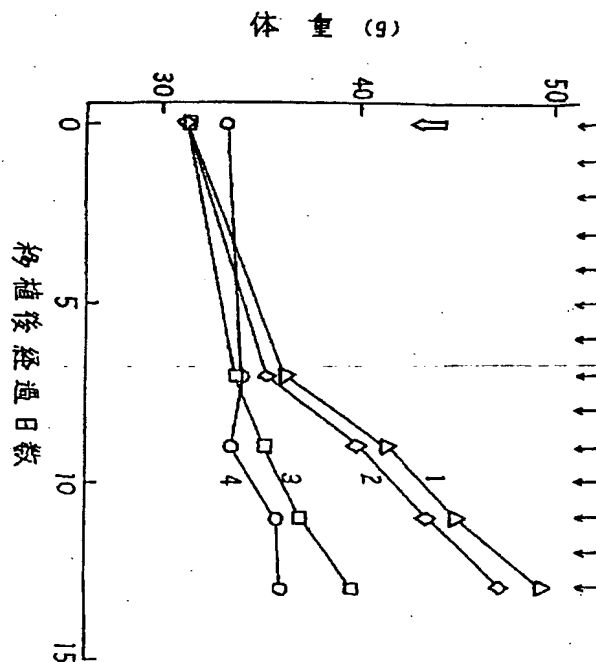
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 制癌作用増強剤

(57) 【要約】

【目的】 自体制癌作用を有する剤と併用することにより、該剤の有する抗癌作用を増強する。

【構成】 大豆クニッツ (Kunitz) 型トリプシンインヒターまたはその誘導体を活性成分とする制癌作用増強剤。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】大豆クニッツ (Kunitz) 型トリプシンインヒビターまたはその誘導体を活性成分とすることを特徴とする制癌作用増強剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、制癌作用増強剤に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】従来から植物由来のプロテアーゼインヒビターが種々報告されている。これらインヒビターには特異性があり、例えば、トウモロコシトリプシンインヒビターやカボチャトリプシンインヒビターは、トリプシンと活性型ハーゲマン因子に抑制活性を示し (Thromb. Res. 20, 149, 1980等)、ダイズトリプシンインヒビターのうちクニッツ (Kunitz) 型トリプシンインヒビターは、トリプシン、血漿カリクレイン、活性型第X因子等に抑制効果を有することが知られている。また炎症性浮腫亢進の際には、ブラジキニンの活性が発現し、疼痛や血管透過性が増大するが、ブラジキニンの活性発現にはハーゲマン因子やカリクレインが関与するスキームが提案されている。

【0003】しかし、プロテアーゼインヒビターと炎症の関係は、in vitroでの研究の段階にとどまっているのが現状で、in vivoでの効果を実証した報告例は極めて少ない。

【0004】一方、胃癌、腎癌、卵巣癌、肝癌等の患者には腹水が、肺癌の患者の場合には胸水が、屢々貯留し、またこれら固形腫瘍の術後播種によって高い確率で腹腔或いは胸腔内に腫瘍が転移し、その結果同様の貯留が認められる。腹水の貯留が生じると、血漿タンパクの低下を来し、患者の体力低下その他の増悪を来すので、治療効果の低下、多量輸血漿の必要性が生じ又、胸水の貯留が生じると呼吸不全をもたらす、ひいては患者の悪疫質の導入を速める等、癌の治療上重大な結末をもたらす。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明者は、炎症抑制とプロテアーゼインヒビターの関連について種々検討した結果、大豆クニッツ (Kunitz) 型トリプシンインヒビター、とりわけその誘導体が、in vivoにおいて炎症性浮腫の抑制に著しい効果があることを見出した。また、炎症における血管透過性増大と固形腫瘍における血管透過性増大の機構が類似していること (固形腫瘍及び炎症部位における血管透過性亢進と血漿成分の漏出が類似) に着目して種々検討する中で、該インヒビター及びその誘導体が癌性胸・腹水貯留抑制にも効果を有すること、即ち、該インヒビターが癌組織における血管透過性を強く阻害し、腹水癌 (Meth A, Sarcoma 180) の系に於いて上記阻害物質の連続投与によって、腹水の貯留を顕著に

抑えて、担癌マウスに延命効果をもたらすこと等を見出し、癌治療上にも有益な薬剤になるとの知見を得、この発明を完成したものである。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】即ち、この発明は、一つは、大豆クニッツ (Kunitz) 型トリプシンインヒビターまたはその誘導体を活性成分とする癌性胸・腹水貯留抑制剤及び炎症性浮腫亢進抑制剤であり、他の一つは、大豆クニッツ (Kunitz) 型トリプシンインヒビターまたはその誘導体を活性成分とする制癌作用増強剤である。

【0007】大豆トリプシンインヒビターは、分子量約2万のクニッツ (Kunitz) 型トリプシンインヒビターと分子量約6千～8千のボウマン・バーク (Bowman-Birk) 型トリプシンインヒビターに二大別される。それらの基本的性質はMethods in Enzymology 19, 853 (1970)、及び、「タン白質研究の新しい視点 (化学的研究を中心として)」第1738頁 (1982) (共立出版) 等によって明らかにされており、その内代表的なクニッツ (Kunitz) トリプシンインヒビターやボウマン・バーク (Bowman-Birk) インヒビターの構造はすでに決定されており (Eur. J. Biochem., 32, 417 (1973)、J. Biochem. 74, 697 (1973))、従って、それらの化学的、生物学的方法 (細胞培養、遺伝子組替等) による合成も今日可能である。

【0008】この発明の剤は、大豆クニッツ (Kunitz) 型トリプシンインヒビター (以下KTI という) を活性成分とするが、KTI は大豆由来のもの、及びこれを限定分解して尚KTI 固有の活性を保持するもの、並びにこれらを上記化学的、生物学的方法により合成して得たものを包含する。

【0009】大豆由来のKTI の調製方法は、すでにかくつかの具体的方法が提案されていて、いずれの方法を採用してもよいが、一般的には大豆、脱脂大豆、大豆ホエーなどを原料にし、これらから、水性媒体または極性有機溶剤 (例えばエタノール、アセトンなど) による抽出、膜分離、等電点沈殿、塩析等による濃縮、分画によって粗精製物を得、これをさらに、ゲル濾過、イオン交換、物理的若しくは化学的吸着手段などによりさらに精製された標品を得ることができ、その活性や純度も、公知の方法例えばクニッツ (Kunitz) のカゼイン消化法 [本明細書での表記は、この方法で測定し、Sigma 社製トリプシン「タイプ-XI」(7500～9000 BAEEUnit/mg の活性蛋白) 1mg を阻害する量を1 Unitとした] やSDS 含有ポリアクリルアミドゲル電気泳動法等により測定することができる。

【0010】活性成分としての量は、精製度、投与方法、残存活性により多少相違するが、1.5～2.5 Unit/mgの活性を有するKTI 蛋白質重量に換算して、概ね腹腔内投与の場合1～3000mg/60kg体重の範囲、静脈注射の場合1～300mg/60kg体重の範囲を目安として定めた含

量が適当である。

【0011】誘導体は、蛋白質であるKTIの抗原性を低下させ、また分解物質(SH-プロテアーゼなど)に対する安定性を増し(生体内半減期の改善)、或いは疎水性を賦与することにより両親媒性を増すといった一または二以上の目的のために使用することができる。このような誘導体は、KTIと、種々の修飾体、例えばスチレンマレイン酸無水物共重合体(SMA)及びその部分エステル化物、ポリエチレングライコール、ビニールエーテル共重合体、ピラン、西独公開特許第315541号に例示のもの等、との結合物、その他低分子の修飾体との結合物等が挙げられ、これらとの結合方法は既知に属するが、上記一または二以上の目的が達成されるものであればどのような方法によってもよい。例えば修飾体がSMAまたはその部分エステル化物の場合は、KTIのN-末端アミノ基乃至リジン残基のε-アミノ基に対して中性乃至アルカリ性溶液中で直接反応させ、ペプチド結合を形成する方法が本発明者である前田らにより報告されている(Journal of Medicinal Chemistry, 28, 455-461, (1985))。

【0012】本物質及びその誘導体は、局所的、経静脈的、経動脈的、経粘膜的、経皮的、経口的な投与及び腹腔内投与することが可能である。

【0013】即ち、例えば静脈注射用の水溶性薬剤として、KTIそのまま、又は生理食塩水、5%グルコース溶液、若しくはその他の水溶性注射剤に溶解しての使用をすることができ、動脈注射用の油剤としてリピオドール化した製剤としても使用することができ、その他、KTIを溶解した水溶液を乳化剤を用いオリーブ油、中鎖脂肪酸エステル、リノール酸エステル、大豆油、桐油等の油脂と乳化しての使用、リポゾームの形態での使用も可能である。

【0014】KTIまたはその誘導体は、自体制癌作用を有する剤と併用することが出来る。自体制癌作用を有する剤としては、ネオカルチノスタン(NCS)、スマンクス[SMANCS:スチレンマレイン酸(SMA)共重合体とネオカルチノスタン(NCS)のアミノ基を介して結合させたもの]、マイトマイシン(商品名)等の抗癌性抗生物質、5-Fu(商品名)等の代謝拮抗剤、ピシバニール(商品名)等の免疫賦活剤、又はその他の抗癌性薬剤を使用することができ、KTIとの併用の態様としては、一製剤に加工して、若しくは単味体を各々個別に投与する方法があげられる。

【0015】

【作用】KTIは炎症性浮腫亢進抑制効果、及び癌性腹水、胸水貯留抑制効果を有し、結果として延命効果を示す。KTIは、さらに、自体制癌作用を有する剤と併用することにより、該剤の有する抗癌作用を増強する。これらの効果の生じる理由は完全には明らかではないが、炎症性浮腫の場合に関与すると考えられるカリクレイン-ブラジキニン系をin vivoにおいてKTIが効果的に阻止

し、ブラジキニンの発現による疼痛発生と血管透過性の亢進を抑制すること、及び、癌組織の血管透過性増大に同様の系が存在して血管透過性を抑制、即ち、該組織への血漿蛋白質などの漏出が抑制され、胸水、腹水の貯留を抑制すること、並びに、該組織への血漿成分-栄養供給が遮断され、抗癌剤の直接の作用力を高めるのではないかと推定される。又プロテアーゼによる癌細胞増殖促進作用を一部には抑制している可能性がある。さらに、KTIの分子量は約2万(誘導体はこれ以上)であるため、血管透過性の亢進していない正常組織への漏出は殆どなく、ある程度血管透過性の亢進した組織への選択的な透過・作用に寄与し、浮腫や癌組織の成長を抑制することも推定される。また、炎症局所の浸出液(漏出液)はリンパから回収されるが、腫瘍組織においてはリンパ系がないので浸出した高分子は回収されずに長期間そこに留まると考えられ、この性質も患部への選択的作用に有用であると考えられる。

【0016】尚、癌組織への栄養供給の遮断は、物理的塞栓療法による栄養供給抑制の考え方と類似するが、物理的塞栓は屢々正常な組織までも壊す弊害があるのに比べ、本発明剤ではこのような副作用は生じない。

【0017】

【実施例】以下この発明の実施例を説明するが、例示は説明用のものであって発明精神の限定を意図したものではない。

実施例1 (KTIの調製例)

低変性脱脂大豆から分離大豆蛋白を製造する過程で得られる大豆ホエーを濃縮し、この濃縮物(粗蛋白質含量5.5%)1容に対し0.5容のアセトンを加えて約1時間攪拌し、遠心分離により得られた上清に対し、さらに1.5容のアセトンを加えて約1時間攪拌し、遠心分離して得られた沈澱画分を、水に対して透析した。この透析液に1/50量の0.5M- 磷酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)を加え、pHを7.0に調節し、DEAE- セルロースイオン交換カラムに通して、該樹脂に吸着させ、次いで0~0.4Mの直線食塩濃度勾配を有する溶出液を、フラクションコレクターにより分画し、BBI型トリプシンインヒビター又はKTIに富む画分をさらに各々塩析濃縮し、(BBI型トリプシンインヒビターについてはCMセルロースイオン交換樹脂でさらに精製し)、各濃縮精製物を等電点沈澱後、凍結乾燥してKTI評品及びBBI型トリプシンインヒビターを得た。各評品の純度は、SDS含有ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、蛋白質中95%以上であった。又、比活性は前者が1.97Unit/mg蛋白、後者が3.37Unit/mg蛋白であった。

実施例2 (腹水貯留抑制及び延命効果)

生後8週目の雌のddY-マウス(1群7匹)の腹腔内にSarcoma 180懸濁液を50万セル/匹になるように移植し、その日から生理食塩水1ccに対して上記調製例で得たKTI若しくはBBI型トリプシンインヒビターを3mg溶解し

た水溶性薬剤又は溶解しない生理食塩水を1日、1匹あたり1ccづつ4日又は14日連続して腹腔内に投与し、その間自由摂食・自由摂水させた。Sarcoma 180 を全く移植しない無処置例も並行して実施した。

【0018】この間の体重測定を行った結果を第1図（14日間投与）及び第2図（4日間投与）に示した。両図に示された結果及び肉眼的観察により、KTI による体重増加の抑制効果（腹水貯留の抑制効果）が明らかに認められ、無処置群との差異が殆ど無かったのに対して、BBI 型トリプシンインヒビターによる該抑制効果は殆ど認められなかった。

【0019】さらに上記投与例での平均生存日数等は次表の通りで、延命効果が認められた。

【0020】

【表1】

投与日数	14日		4日
群	平均生存日数	20日目の生存率(%)	平均生存日数
コントロール	19.1日	28.6	21.4日
KTI	26.0日	100.0	24.8日
BBI型	21.9日	71.4	21.0日

実施例3（部分ブチル化SMA と結合した誘導体の調製例）

実施例1の方法で調製したKTI 300mgを、30ccの0.5M炭酸水素ナトリウム液に溶解し、部分ブチル化SMA(平均分子量約2000)を150mg 加えて25℃で90分間攪拌した後、グリシン溶液を加えて反応を停止した。このものの残存活性は36.3%であり、TNBS法(蛋白質、核酸、酵素、18(13), 1153-1159, (1973))にて測定した修飾されたアミノ基の個数は1.94個/分子であった。さらに炭酸水素アンモニウム溶液に透析し、凍結乾燥してKTI のSMAで修飾された誘導体(KTI-SMA)を得た。

実施例4（炎症性浮腫亢進抑制剤）

実施例3で得た修飾したKTI-SMA を生理食塩水に溶解したものを被験薬とし、該被験薬又は生理食塩水と混合して調製した1%カラゲニン溶液(KTI-SMA の含量は各々5mg/cc、又は15mg/cc)をSD系雄ラット(平均体重150g ± 5g、1群5匹)に対して、0.1cc/部位投与して炎症を惹起し、経時的に足容積を測定することにより、カラゲニン誘発足浮腫に対する抑制効果を調べた結果は第3図の通りであった。

【0021】同図に示されるように、炎症惹起後3時間の時点において、KTI-SMA 15mg/cc投与群に顕著な炎症性足浮腫抑制効果が認められた。

【0022】尚、KTI-SMA に代えて実施例1で得た無修飾のKTI 20mg/ccを使用したものの抑制効果はKTI-SMA

5mg/cc投与群と同程度の効果にとどまった。

実施例5（制癌剤増強作用の効果）

生後8週目の雌のd d Y-マウス(1群10匹)の腹腔内にSarcoma 180 懸濁液を50万cell/匹になるよう移植し、その日から生理食塩水に対して前記調製例で得たKTI、ネオカルチノスタチン(NCS)又は両者の混合物を1日、1回7日間連続投与し、生理食塩水のみを投与した群をコントロールとした。実験期間中は自由摂食・自由摂水させた。

【0023】投与量及び、生存率(%)の推移を次表に示した。

【0024】

【表2】

群	投与量 mg/kg 体重	生存率(%)		
		20日	30日	50日
コントロール	—	10	0	0
KTI	100 (a)	100	30	0
NCS	0.01 (b)	100	30	0
KTI+NCS	(a)+(b)	100	60	40

上表の結果が示すように、KTI は自ら延命効果を有するのみならず、制癌剤(NCS)の効果を高める相乗作用を有することが認められた。

【0025】

【発明の効果】以上説明したように、KTI 及びその誘導体を有効成分とする剤は、炎症性浮腫の抑制及び癌性胸水腹水の貯留抑制効果並びに制癌作用増強効果を有する。炎症性浮腫の抑制は浮腫による疼痛の発生または亢進を未然に抑制し、胸水腹水の貯留抑制により、該貯留による弊害例えば、患者の体力低下、治療効果の低下、多量の輸血漿、呼吸不全、悪疫質の導入等を未然に防止乃至抑制し、治療効果を高める等、延命させる効果がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例2における投与薬剤と体重増加(≒復水貯留量)の関係を示すグラフである。

【図2】実施例2における投与薬剤と体重増加(≒復水貯留量)の関係を示すグラフである。

【図3】実施例4における足浮腫の容積変化を示すグラフである。

【符号の説明】

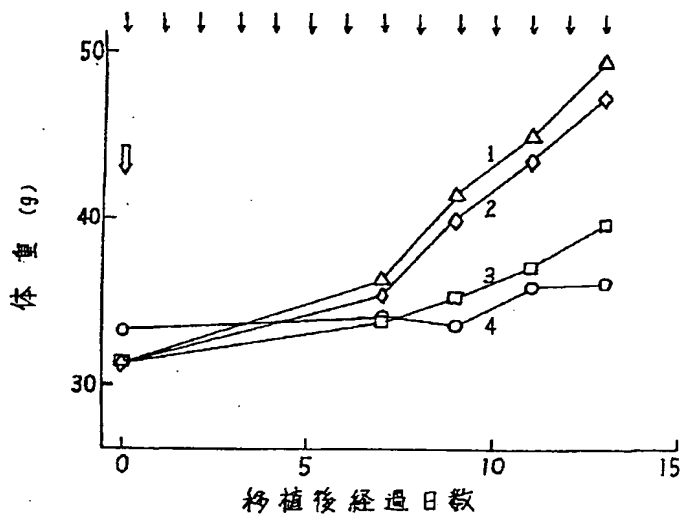
図1中(1)(△).... 生理食塩水投与群(Sarcoma 180 担癌対照)、(2)(◇).... BBI トリプシンインヒビター投与群、(3)(□).... KTI 投与群、(4)(○).... 無処置群(非癌対照)、(白抜き矢印).... 癌細胞移植日、(↓).... 薬剤投与日。図2中(1)(○).... 生理食塩水投与群(Sarcoma 180 担癌対照)、(2)(△).... BBI トリプシンインヒビター投与群、(3)(□).... KTI 投与群、

(5)

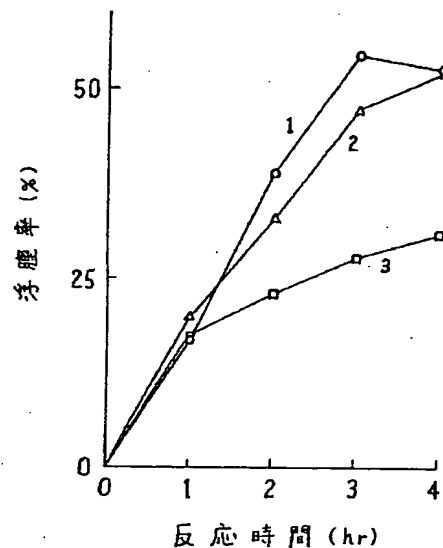
(折破線).... 無処置群(非癌対照)、(白抜き矢印).... 癌細胞移植日、(↓).... 薬剤投与日。図3中、(1)(○).... 生理食塩水投与群、(2)(△).... KTI-

SMA 5mg /cc投与群、(3)(□).... KTI-SMA 15mg/cc投与群。

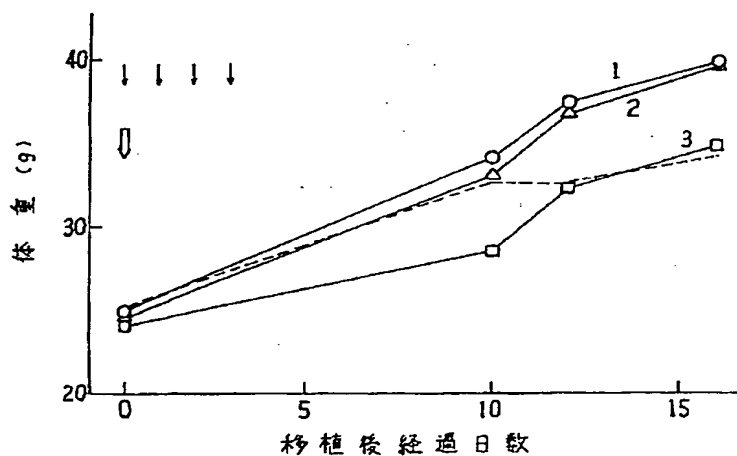
【図1】



【図3】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 高松 清治  
大阪市大正区鶴橋 1-13-10

(72)発明者 下田 忠久  
大阪府泉南市新家1315-30